



P.- 8170.-
Nº. 55062 - P C 430.-

MALA FERRODUCCION
POR DEFECTO DEL ORIGINAL

23 MAY. 1950

12
193 112

MEMORIA DESCRIPTIVA 193 112
para solicitar

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

e n

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de CHAS. PFIZER & CO., INC., entidad norteamericana, establecida en 11 Bartlett Street, Brooklyn, Nueva York, Estados Unidos de América, por:

"UN PROCEDIMIENTO PARA PRODUCIR UN ANTIBIOTICO".

-o-

Este invento se refiere a una sustancia antibiótica nueva y útil que denominamos Viomicina, y a un procedimiento para su preparación por cultivo de ciertas cepas de un nuevo micro-organismo que llamamos en esta Memoria "Streptomyces puniceus". Este organismo se aisló de una muestra de terreno tomada cerca de Cienfuegos (Cuba). Su descripción, de acuerdo con la clave del "Manual of Determinative Bacteriology", de Bergey, 6a. edición, páginas 929-933, es como sigue:

10

Las características de cultivo de esta especie, re-



193112

feridas al número aislado 1314-5, se dan más abajo en forma tabular. (Los colores, cuando se menciona R, son los de la obra de Ridway "Color Standards and Nomenclature")

5 Las lecturas se refieren a diez tubos de ensayo excepto para los azúcares (2 tubos).

Medio	Magnitud del crecimiento.	Color		Observaciones
		Micelio aéreo y esporas	Pigmento soluble	
Glucosa-asparagina-agar.	moderado	La parte esporulada varía desde <u>Pearl Gray</u> y <u>Pallid Vinaceous Drab</u> a (usualmente) <u>Pale Olive Gray</u> u <u>Olive Buff</u> (R); parte ccrea <u>Neutral red</u> a <u>Corinthian Purple</u> (R).	ninguno	Colonia elevada; borde liso; superficie áspera; esporulación buena, puntas de hifas y conidióforos rojas o rosas; conidios 0,65 x 1,30 μ , oblongos, en cadenas, tres tipos de colonias (de aproximadamente 110 colonias): 1) 25 colonias completamente esporuladas cerca del <u>Pale Olive Gray</u> (R), 2) aproximadamente 80 colonias con poca esporulación, <u>Blanco</u> a <u>Pallid Brownish Drab</u> (R) micelio aéreo cubierto de gotitas incoloras; (3) aproximadamente 5 colonias con superficie ccrea, sin micelio aéreo, pero estructuras a modo de cremas que a menudo tenían hifas esporulantes en la punta; todas las colonias tenían micelio vegetativo cercano al <u>Corinthian Purple</u> (R).
Gelatina	moderado	<u>Blanco</u> a <u>Pale Olive Buff</u> (R)	ninguno	Fuerte licuación
Lechada de tor-nasol.	escaso	anillo pardo	pardo oscuro	No hubo hidrólisis o peptonización, el pH cambió desde 6,2 a 6,3-6,7 ₂



193112

Malato de Ca.	Bueno a moderado.	Blanco en 4 tubos de forma normal de malato, <u>Pale Olive Buff</u> (R) en 2 tubos de forma 1, en otros 4 tubos de forma 1 centro de colonia <u>Pallid Mouse Gray</u> con bordes cercanos al <u>Pale Chalcedony Yellow</u> (R)	ninguno	Reverso blanco en 6 tubos de forma normal y 1 de malato, amarillento en 4 tubos de 1 malato.
Celulosa.	ningún crecimiento o muy escaso.			
Glucosa-agar.	bueno	Blanco a <u>Pallid Mouse Gray</u> (R).	Pardo	Superficie arrugada, agrietada; reverso pardo.
Patata.	bueno.	<u>Pale Olive Gray</u> (R) o manchado con <u>Pallid Quaker Drab</u> (R); regiones ceras Deep <u>Livid Purple</u> (R).	Pardo oscuro.	Colonias arrugadas.
Placas de fécula.	escaso	<u>Pale Vinaceous Lilac</u> a <u>Pale Smoke Gray</u> y <u>Pallid Brownish Drab</u> (R)	Ninguno	Débilmente hidrolizado. Reverse rojo neutro a <u>Dark Corinthian Purple</u> (R).
Agar sintético.	moderado.	<u>Pale Olive Drab</u> a <u>Pallid Mouse Gray</u> (R)	Ninguno	Reverso <u>Livid Purple</u> (R)
Agar nutricional.	moderado	Blanco.	ninguno	Reverso blanco.
de Emerson.	bueno.	<u>Pale Olive Gray</u> (R); regiones ceras cercanas al <u>Light Vinaceous Drab</u> (R)	ninguno.	Reverso cercano al <u>Deep Purplish Vinaceous</u> (R).
d-xilosa	moderado	<u>Pallid Vinaceous Drab</u> (R)	ninguno	Reverso <u>Corinthian Purple</u> (R).



193112

L-ara- binosa	escaso	<u>Pallid Mouse Gray (R)</u>	ninguno	Reverso <u>Light cinnamon Drab</u> o <u>Vinaceous Drab (R)</u> .
I-ram- nosa	escaso	Blanco.	ninguno	Reverso blanco.
levu- losa	moderado	<u>Pallid Vina- ceous Drab (R)</u>	ninguno	Reverso <u>Corinthian Pur- ple (R)</u> .
Galac- tosa	moderado	<u>Pale Olive Gray (R)</u>	ninguno	Reverso <u>Dark Vinaceous Purple (R)</u>
Saca- rosa	escaso	Blanco	ninguno	Reverso blanco.
Mal- tosa	moderado	<u>Pale Olive Gray (R)</u>	ninguno	Reverso <u>Dark Vinaceous Purple (R)</u>
lacto- sa	escaso	Blanco	ninguno	Reverso blanco.
Rafi- nosa	escaso	Blanco.	ninguno	Reverso Blanco.
Inulina	escaso	Blanco	ninguno	Reverso blanco.
D-mari- tol	bueno	<u>Pale Olive Gray (R)</u>	ninguno	Reverso cercano al <u>Dark Vinaceous Purple (R)</u>
D-sor- bitol	escaso	blanco	ninguno	Reverso blanco
Dulci- tol	escaso	blanco	ninguno	reverso blanco
Inosi- tol	escaso	blanco	ninguno	reverso blanco
Sali- cina	escaso	<u>Pallid Mouse Gray (R)</u>	ninguno	Reverso <u>Light Cinnamon Drab (R)</u>
citra- to de Na	escaso	<u>Pallid Mouse Gray (R)</u>	ninguno	Reverso pardo muy claro
Succi- nato de Na	escaso	<u>Pallid Mouse Gray (R)</u>	ninguno	Reverso blanco
Hierro de Kli- gler	bueno	medio inalte- rado.		
Tirosi- nato-agar	escaso	cercano al <u>Drab Gray (R)</u>	ninguno	Colonia delgada, c�rea, plana, translúcida; re- verso pardo claro.



193112

caldo moderado
de ni-
tratos.

Nitratos reducidos.

Tubos sin cre-
agita- cimiento
dos de debajo de
agar nu- la super-
tricio ficie.

Parafi- sin creci-
na miento.

Este invento pretende también incluir los mutantes del mencionado microorganismo, que puedan producirse por agentes de mutación tales como los rayos X, la radiación ultravioleta, mostazas nitrogenadas, etc.

5 Los antibióticos producidos por organismos del género Streptomyces de los Actinomicetos de los cuales son muy conocidos hoy varios, caen dentro de dos clases: 1) sustancias neutras que pueden extraerse de los caldos a pH ácido, neutro y alcalino por medio de disolventes, y 2) sustancias
10 básicas que en general no pueden ser extraídas por disolventes orgánicos. La cloromicetina y la actinomicina son típicos del primer grupo, y la estreptomicina y la estreptotricina del segundo. Por este criterio, la viomicina es un miembro del segundo grupo. La viomicina comparte también con este
15 grupo la propiedad de ser precipitada por ciertos colorantes ácidos tales como el Erio Chrome Violet, El Pontamine Fast Orange, El rojo S de alizarina, el azul de sintraceno, el Pontamina Steel Blue, el Pontamine Green, y otros colorantes similares del ácido sulfónico. El grupo básico al cual
20 pertenece la viomicina se caracteriza por un amplio espectro antibiótico, particularmente entre las bacterias Gram-negativas. La tabla siguiente muestra los espectros bacteriales



193112

comparativos de la estreptomina, la estreptotricina, la cloromicetina, la aureomicina, y la viomicina:

Tabla I

Megr. por ml. de antibiótico necesarios para inhibir el crecimiento de micro-organismos en placas de agar nutritivo.

Organismo	1 aureomicina	2 cloromicetina	3 estreptomina	4 estreptotricina	5 viomicina
S. aureus	0,9	7	4	6	50
S. albus	0,9	7	6	5	100
B. subtilis	1	5	5	30	100
B. mycoides	0,9	4	7	70	80
Org. de Bodenheimer	1	500	> 1000	10	500
S. typhosa	5	4	10	10	100
S. pullorum	2	5	30	5	100
S. paratyphi A	5	5	20	5	100
S. paratyphi B	5	5	30	10	100
K. Pneumoniae	7	5	10	5	30
Sh. paradysenteriae	5	1	10	7	100
E. Coli	5	5	5	7	100
A. aerogenes	0,9	2	5	5	30
Ps. aeruginosa	10	20	10	10	> 3000
Proteus sp.	50	80	10	8	500
M. Albicans	2000	> 2000	> 2000	100	> 3000

1 hidrocioruro cristalizado

2 cristalizada

3 sulfato de estreptomina (750 u. estreptomina/mgr.) expresado como mgr. de base activa.

4 sulfato de estreptotricina (ex heliantato cristalizado, 800 u. estreptomina/mgr.).

5 sulfato de viomicina bruto amorfo, que se cree contiene un 10% aproximadamente de ingrediente activo.



193112

La viomicina se diferencia además de los antibióticos conocidos obtenidos de los *Streptomyces* comparando la actividad de los preparados de estos antibióticos con cepas de bacterias hechas resistentes al antibiótico por transferencia sucesiva a caldos que contienen cantidades progresivamente crecientes del antibiótico, con relación a la cepa original sensible. La Tabla siguiente en la cual la dosificación ha sido reducida a unidades de dilución de *E. coli* por mililitro ilustra esto. La potencia de cada antibiótico se determinó primero encontrando el volumen total en mililitros de un caldo nutritivo, que contiene un cultivo patrón de *E. coli*, que podía mantenerse libre de crecimiento por un miligramo del antibiótico después de incubación de 18 horas a 37° C. Este número de mililitros se denominó el valor CDU para ese antibiótico. Luego, a fin de comparar los antibióticos a igual actividad biológica, se eligieron valores CDU uniformes de 50 y 100/mililitros y el peso requerido de cada antibiótico empleado para dar tales valores.

Tabla II

Comparación de la acción de diversos antibióticos contra cepas de *A. aerogenes* en caldo nutritivo.

Organismo	estroptomycina		estreptotricina		cloromicetina		viomicina	
	50 (CDU/ml.)	100	50	100	50	100	50	100
<i>A. aerogenes</i> (cepa A)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. aerogenes</i> (cepa B)	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>A. aerogenes</i> (cepa C)	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>A. aerogenes</i> (cepa D)	+	+	+	+	-	-	+	+

+ = crecimiento

- = sin crecimiento

30/9

193112



- A. La cepa A de *A. aerogenes* es sensible a 25 CDU/ml. de todos los mencionados antibióticos.
- B. La cepa B de *A. aerogenes* es resistente a 200 CDU/ml. de cloromicetina.
- C. La cepa C de *A. aerogenes* es resistente a 4400 CDU/ml. de estreptomomicina y aproximadamente 25 CDU/ml de estreptotricina.
- D. La cepa D de *A. aerogenes* es resistente a 7500 CDU/ml. de estreptotricina y aproximadamente 200 CDU/ml. de estreptomomicina.

En la Tabla II puede verse que la viomicina es capaz de retardar el crecimiento de cepas de *A. aerogenes* hechas resistentes a la estreptomomicina y cloromicetina, pero no de cepas resistentes a la estreptotricina. Esto distingue claramente a la viomicina de todos estos antibióticos, salvo la estreptotricina.

La viomicina puede distinguirse de la estreptotricina y de la estreptomomicina por su comportamiento sobre un cromatograma en el papel en un sistema de agua saturada con n-butanol que contiene 2% de piperidina y 2% de ácido p-toluenosulfónico realizado durante 96 horas a 25° C usando *B. subtilis* como organismo de ensayo.

	<u>Antibiótico</u>	<u>Rf</u>
15	Estreptomomicina A	0,38
	Estreptotricina	0,04
	Viomicina	0,06

La viomicina es estable cuando se hierve durante 15 minutos a una concentración de 500 microgramos por ml. en agua a pH 2, 6,5 y 9.

La toxicidad de diversos antibióticos, con inclusión de la viomicina, se da en la Tabla III.

MALA REPRODUCCION
 POR DEFECTO DEL ORIGINAL



193112

Tabla III

Toxicidad de diversos antibióticos.
 (Mgr. por ratón de 20 grs)

5	Antibiótico.	Intravenosa		Subcutánea		Oral	
		LD ₀	LD ₅₀	LD ₀	LD ₅₀	LD ₀	LD ₅₀
	Sulfato de estreptomina.	2,5					
	Sulfato de estreptotricina	4					
10	Cloromicetina	0,6					
	Hidrocloruro de aureomicina	1,50					
15	Sulfato de viomicina (bruto)	6	7	10	35	>200	indeterminado.

La viomicina puede producirse cultivando Streptomyces punices, con preferencia a 24°C - 30°C en condiciones sumergidas de agitación y aireación sobre medios que contienen una fuente de carbohidratos, tales como azúcares, féculas, glicerol; una fuente de nitrógeno orgánico, tal como harina de habas de soja o gluten de trigo; una fuente de sustancias de crecimiento, tales como solubles de destilería; sal común y carbonato de calcio como agente tampón. Una vez que ha terminado el crecimiento, el micelio se separa y el antibiótico es precipitado del caldo, por ejemplo, por la adición de colorantes de ácido sulfónico tales como Erio Chrome Violet, Pontamina Fast Orange, etc. La torta de colorante se descompone luego y el antibiótico se separa del filtrado.

El inóculo puede obtenerse empleando un cultivo de tubos inclinados a botellas de Roux inoculados con S. puniceus. Un medio sólido adecuado para este crecimiento inicial



1850

193112

consiste en:

- 5 Dextrosa 10 grs.
- Extracto de carne de buey 4 "
- Peptona 4 "
- Extracto de levadura . . . 1 "
- Cloruro de sodio 2,5 "
- Agua destilada hasta . . . 1000 mls.
- Ajústese el pH a 7 y añádase
- Agar 30 grs.

10 Este cultivo se usa para inocular matraces agitados o depósitos de inóculo sumergido; o alternativamente los depósitos de inóculo pueden inocularse desde el matraz agitado. En un matraz agitado, el cultivo habrá alcanzado su máximo, en general, en 4 días, al paso que el inóculo en un

15 depósito de inóculo sumergido estará en su período más favorable usualmente en dos días. Desde el depósito de inóculo, el caldo mezclado con el microorganismo es forzado dentro del fermentador en condiciones completamente estériles y el crecimiento se continúa durante otro período de dos días. En

20 todo momento, la aireación se mantiene en los depósitos del fermentador insuflando aire estéril a través de un atomizador en proporción de 1/2 a 2 volúmenes de aire libre por volumen de caldo por minuto, mientras el caldo es agitado. Se mantiene esterilidad completa en todo momento y la temperatura del caldo, en general, se mantiene entre 24°C y 30°C.

25 El invento podrá comprenderse con más facilidad considerando los siguientes ejemplos ilustrativos de su realización:

Ejemplo I

Se preparó un medio con la composición siguiente:



193112

Harina de habas de soja	10	grs.
Dextrosa	10	"
Cloruro de sodio	5	"
Solubles de destilería	0,5	"
Agua hasta	1000	mls.
Ajustando el pH a 7 con KOH y añadiendo		
Carbonato de calcio	1	gr.

De este medio se distribuyó 500 mls. a un matraz de Ferback de 2,8 litros, y se esterilizó durante 30 minutos a 121°C. Después de enfriamiento, el medio se inoculó con una suspensión de S. puniceus desde un cultivo inclinado o botella de Roux de inóculo como antes se describió. Los matraces se agitaron en un agitador rotativo con un desplazamiento de 63 mm. a 200 r.p.m. a 27°C durante 4 días. En ese momento se comprobó que el caldo tenía una potencia de 320 CMU por ml. y que el pH era de 7,3. La mezcla de caldo y micelio se ajustó a pH 2 con H₂SO₄, se añadió una pequeña cantidad de Super-cel y la mezcla se filtró. La mezcla clara se ajustó a pH 5,5 y se añadió Erio Chrome Violet en proporción de 2 grs. por litro, con agitación. La agitación se continuó durante una hora aproximadamente a la temperatura ambiente, se añadió Super-cel suficiente para permitir la filtración y la torta se separó por filtración y se lavó con 20% del volumen original de agua. Cuando estuvo seca, la torta se puso en suspensión en 1/12 del volumen original de metanol 80% y se descompuso con ayuda de 1 gr. de BaCl₂.2H₂O por cada 2 grs. de Erio Chrome Violet, agitando durante dos horas a la temperatura ambiente. Después de filtración, el filtrado metanólico se decoloró con una pequeña cantidad de carbón y se filtró de nuevo. Al filtrado incoloro se le añadieron 2 volúmenes de



1950

198112

metanol absoluto y 2 mls. de una solución al 50% de sulfato de trietilamina en metanol por cada gramo de $BaCl_2 \cdot 2H_2O$. Con ayuda de Super-cel se separó por filtración un precipitado de sulfato de bario y sulfato de viomicina. La torta se lavó con metanol absoluto y luego se agitó con agua para disolver el sulfato de viomicina y el sulfato de bario y el Super-cel se separaron por filtración. La solución acuosa incolora resultante de sulfato de viomicina se secó. El polvo blanco amorfo resultante mostró una actividad de 40 CDU por miligramo.

Ejemplo II

Se preparó un medio con la composición siguiente:

Gluten de trigo	10	grs.
Glicerol	10	"
Caseína	5	"
Melazas de remolacha	2	"
Licor de fermentación de maíz	2	"
Solubles de destilería	2	"
Ajustando el pH a 7 con KOH y añadiendo		
Carbonato de calcio	5	"
Agua del grifo hasta	1	litro
Aceite de soja	1	ml.
Esterilizando 45 minutos a 121°C		

75 litros del citado medio en un depósito de inoculante agitado, de 180 litros, se inocularon con 2 litros de inóculo hecho como antes se describió por el cultivo sumergido de S. puniceus y mantenido a 27°C durante 24 horas con agitación constante mientras se inyectó aire estéril a través del caldo a aproximadamente 1 a 1,5 volúmenes de aire libre por volumen de caldo por minuto. Al cabo de 24 horas el inoculante preparado como antes se ha dicho se transfirió en condiciones completamente estériles a 550 litros del mismo



medio en un fermentador de 900 litros. La agitación y la aireación fueron las mismas como en el depósito de inoculante y al cabo de 48 horas a 27°C, el caldo resultó tener una potencia final de 100 CDU por ml.

5 Ejemplo III

Se preparó un medio con la composición siguiente:

	Gluten de trigo	10	grs.
	Glicerol	10	"
10	N-Z-amina B.	5	"
	(hidrolizado de caseína)		
	Melazas de remolacha	2	"
	Licor de fermentación de maíz	2	"
	Solubles de destilería	2	"
15	Agua del grifo, hasta	1000	mls.
	Ajustando el pH a 7 con KOH y añadiendo		
	Carbonato de calcio	5	"

Cuatro matraces de Fernback de 2,8 litros, conteniendo cada uno un litro del citado medio se esterilizaron 20 minutos a 121°C. Después de enfriamiento, se inocularon con una suspensión de S. puniceus procedente de un cultivo inclinado y se agitaron en un agitador rotativo durante 48 horas a 28°C. Se usó una mezcla de caldo y micelio para inocular un fermentador de 180 litros que contenía 75 litros del mencionado medio que se había esterilizado durante 20 minutos a 121°C en condiciones estrictamente asépticas. La agitación fué dada por un agitador del tipo de hélice mientras el fermentador se mantuvo bajo presión positiva de aire por la admisión a través de un pulverizador de aire estéril. Al cabo de 48 horas, el caldo resultó tener una potencia de 100 CDU/ml.

El caldo, que asciende a 75 litros, se separó del micelio por filtración, se ajustó a pH 6,5 con H₂SO₄ y se



193112

añadieron 240 gramos de oxalato amónico para precipitar el micelio como oxalato que luego se separó por filtración. El caldo claro se ajustó a pH 5,5, con H_2SO_4 y se añadieron 160 gramos de Bio Chrome Violet y el caldo se agitó durante 1,5 horas. El precipitado de colorante se separó del caldo agotado con ayuda de Super-cel. La torta de colorante se lavó con 16 litros de agua y se secó insuflando aire a través del filtro-prensa. La torta seca de colorante se puso en suspensión en 3 litros de una mezcla de 80% de metanol y 20% de acetona y se añadieron 250 ml. de una solución metanólica al 50% de sulfato de trietilamina y el conjunto se agitó durante 1,5 horas. El precipitado de sulfato de viomicina con Super-cel se separó por filtración y se lavó con acetona y luego con metanol. La torta seca se agitó luego durante 1/2 hora en 2 litros de agua destilada y el Super-cel se separó de la solución de sulfato de viomicina por filtración. Una solución incolora clara de sulfato de viomicina se secó y el sólido blanco amorfo resultó tener una potencia de 370 CDU por milígramo.

En los ejemplos que anteceden, ha de entenderse que las composiciones de los medios de cultivo son meramente ilustrativas y pueden variarse dentro de límites relativamente amplios, por ejemplo, sustituyendo el gluten de trigo por harina de semillas de algodón o harina de habas de soja, etc. Análogamente, las condiciones de la fermentación, tales como la agitación, la proporción de la aireación, la temperatura, etc., pueden variarse en medida considerable.



193112

Muchos métodos alternativos y variaciones del método descrito de recuperar el antibiótico tales como, por ejemplo, extracción con disolventes a diversos pH, adsorción sobre alúmina activada, resinas de permutación catiónica o carbón vegetal; elución con disolventes ácidos o neutros, etc.

Pueden hacerse modificaciones al llevar a cabo el presente invento sin apartarse por ello de su espíritu y alcance y el invento sólo ha de entenderse limitado por las reivindicaciones anejas.

Esta solicitud, que corresponde a la presentada en los Estados Unidos de América, el 25 de Agosto de 1949, bajo el Número 112.412, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto Ley sobre Propiedad Industrial.

-----N O T A-----

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta Patente de Invención en España, son los siguientes:

1º. Un procedimiento para producir viomicina, que comprende cultivar una cepa de Streptomyces puniceus en una solución nutritiva acuosa que contiene carbohidrato, en condiciones aerobicas sumergidas, hasta que se le comunique actividad antibacteriana sustancial, y recuperar del caldo la

**MALA REPRODUCCION
POR DEFECTO DEL ORIGINAL**



198112

viomicina así producida.

5 2º. Un procedimiento para producir viomicina, que comprende cultivar una cepa de Streptomyces puniceus en un medio de cultivo acuoso que contiene una sustancia favorecedora del crecimiento y que se mantiene en condiciones de crecimiento aerobico sumergido a una temperatura de unos 25º C a unos 30º C, durante un período de varios días a una semana, y recuperar del mismo el antibiótico, viomicina, así producido.

10 3º. Un procedimiento para producir viomicina, que comprende cultivar una cepa de Streptomyces puniceus en un medio nutritivo acuoso que contiene solución de carbohidrato en condiciones aerobias, hasta que se le comunique actividad antibacteriana sustancial a dicha solución.

15 4º. Un procedimiento según se reivindica en los puntos 1º., 2º. ó 3º., en el cual se produce una sal de viomicina.

5º. Un procedimiento según se reivindica en los puntos 1º., 2º. ó 3º., en el cual se produce sulfato de viomicina.

20 6º. Un procedimiento para producir un antibiótico. Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y para los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de diez y seis hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid a -1 SEP. 1950

Alberto de E'reburu

Por Poder
Orl